云 南 植 物 研 究 2008, 30 (1): 95～98
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724/SP. J. 1143. 2008. 07078

高温对萝芙木细胞膜、膜脂和抗坏血酸代谢造成的损伤

田学军[1], 龙云惠[2], 张德刚[1], 何 英[2]
(1 红河学院生物系, 云南 蒙自 661100; 2 红河学院化学系, 云南 蒙自 661100)

摘要: 通过高温胁迫下萝芙木叶片电导率、膜脂过氧化物丙二醛 (MDA)、自由基清除剂抗坏血酸的变化研究, 探讨高温对萝芙木组织造成的损伤及自由基清除剂代谢的影响, 从而揭示高温胁迫下萝芙木生长发育迟缓的原因。结果表明, 热胁迫对萝芙木细胞膜造成损伤, 使膜脂更多地被过氧化, 抗坏血酸含量下降, 致使萝芙木受到热损伤和氧化损伤, 最终可能使其生长发育放缓, 开花结果推迟。研究还表明, 萝芙木经适当高温 (37℃) 热驯, 能产生较多的抗坏血酸, 以清除热胁迫诱导产生的氧自由基, 降低氧化损伤程度。
关键词: 萝芙木; 热胁迫; 电导率; 丙二醛; 抗坏血酸
中图分类号: Q 945 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253 - 2700 (2008) 01 - 095 - 04

Effect of High Temperature on the Cell Membrane, Membrane Lipid, and Ascorbic Acid Metabolism in Rauwolfia (*Rauvolfia vericillata*, Apocynaceae)

TIAN Xue-Jun[1], LONG Yun-Hui[2], ZHANG De-Gang[1], HE Ying[2]
(1 *Department of Biology*, *Honghe University*, Mengzi 661100, China;
2 *Department of Chemistry*, *Honghe University*, Mengzi 661100, China)

Abstract: To explore the mechanism of growth retardation under high temperature in Rauwolfia (*Rauvolfia vericillata*), the effects of high temperature on membrane integrity, lipid peroxidation, and antioxidant ascorbic acid were examined by measuring the electric conductivity, membrane lipid peroxide malondialdehyde (MDA), and changes of ascorbic acid in Rauwolfia leaves . The results showed that exposure to high temperature (44℃ and 50℃) resulted in increases in electric conductivity and MDA, and decrease in levels of abscorbic acid . Heat acclimation, pretreatment at 37℃, however, maintains ascorbic acid at higher levels than that without heat acclimation, which may be helpful for Rauwolfia to resist heat stress .
Key words: *Rauvolfia vericillata*; Heat stress; Electric conductance; Malondialdehyde (MDA); Ascorbic acid

过高的环境温度将对植物造成热胁迫 (heat stress, HS) 和热损伤, 并进一步诱发氧化胁迫, 对生物造成氧化损伤。不过, 当各种生物暴露在高于其适宜生长温度下, 它们具有存活的本能 (基本耐热性) 及获得抵御致死热胁迫的耐热性 (获得性耐热性)。在热胁迫前经中等高温 (能存活) 短期热驯 (heat acclimation) 或经其他非致死胁迫, 生物可获得获得性耐热性 (Vierling, 1991; Hong and Vierling, 2000; Larkindale 等, 2005)。许多研究证实, 热激蛋白 (HSPs)、脱落酸、水杨酸、乙烯、活性氧中间体 (reactive oxygen species, ROS) 信号、膜脂成份、抗氧化剂 (抗坏血酸、谷胱甘肽、过氧化氢酶) 等途径包括在植物的耐热性中。其中, HSPs 的产生是获得性耐热性的显著特征 (Vierling, 1991)。

隶属于夹竹桃科萝芙木属 (*Rauvolfia* L .) 的萝芙木 [*R. vericillata* (Lour .) Bail .] 是国产成药“降压灵”的原料 (陈维新等, 1979), 在山地

收稿日期: 2007 - 04 - 07, 2007 - 07 - 12 接受发表
作者简介: 田学军 (1962 -) 男, 副教授, 主要从事植物生理学方面的研究。Tel: (0873) 3699787; E-mail: txj_biology2@126.com

灌丛、山坡阴湿林下、溪边潮湿肥沃的地方广泛分布，属于半阴性植物，(管志斌，2004)。为科研所需，本课题引种萝芙木，其中，一部分植于大棚内，另一部分露天种植。露天定植的植株长势良好，1年多即开花结果，而大棚内的植株长势较露天的差，并且没有开花结果。为探讨其原因，本研究以室内培养的萝芙木扦插苗叶片为材料，测定了经高温胁迫的叶片的电导率、膜脂过氧化产物丙二醛（MDA）和自由基清除剂抗坏血酸含量。就萝芙木而言，这方面的研究尚未见报道。测定植物组织电解质的电导率已被用于植物获得性耐热性的定量分析（Lohmana 等，2004），MDA积累用作热胁迫引起的脂过氧化标识（Smirnoff，1995），抗坏血酸则是植物非酶自由基清除系统中的重要抗氧化剂，在清除氧自由基中起重要作用（Xu 等，2006）。

1 材料和方法

1.1 萝芙木种植

原植物（均为扦插成活的无性繁殖苗）于2005年3月从绿春县引种，分别在红河学院塑料大棚内及露天栽培，所用栽培基质为红壤土和腐熟农家肥。塑料大棚无空调设备，夏季棚内温度有时高达40℃以上；露天栽培的春夏季套种高粱。

1.2 供试萝芙木叶片材料

在培养室（22℃，16 h光照/8 h黑暗）内培育的萝芙木扦插苗幼嫩叶片，同一试验所用叶片叶龄相同。每个处理（热胁迫）温度5个重复。

1.3 试剂

三氯乙酸，硫脲，二硝基苯肼，硫酸，抗坏血酸，硫代巴比妥酸，氢氧化钠。均为分析纯。

1.4 设备

电导率仪（JEY-45001，Jenway，England），高速冷冻离心机（Eppendrof Centrifuge 5810 R，Germany），双光束紫外可见分光光度计（TU-1901，北京普析通用仪器有限公司）。

1.5 萝芙木叶片热胁迫处理

1.5.1 电导率测定　叶片从植株上剪下，用去离子水冲洗干净，置于垫有经去离子水饱和的滤纸的平皿内，密封，分别放入44℃、50℃水浴中加热（热胁迫）2 h。设对照（置于22℃培养室内）。

1.5.2 MDA测定　叶片从植株上剪下，立即称重每个叶片，置于垫有经去离子水饱和的滤纸的平皿内，密封，分别置于44℃、50℃水浴中加热2 h，其后用于提取MDA。设对照（置于22℃培养室内）。

1.5.3 抗坏血酸测定　叶片剪下，每个叶片分别称重，置于垫有经去离子水饱和滤纸的平皿内内，分别设定为对照、热驯、直接高温胁迫3组。其中，对照组置22℃培养室；热驯组置于37℃水浴热驯1 h，转入22℃培养室恢复1 h，再置于50℃水浴热胁迫2 h；直接高温胁迫组直接放入50℃水浴热胁迫2 h。

1.6 电导率测定

仿 Lohmann 等（2004）方法并适当改进。经去离子水洗净的1个叶片放入盛有5 ml去离子水的具塞试管内，置于25℃，120 r/min摇床振荡1 h，然后测定初电导率（EC i）；测毕，试管转入100℃沸水浴中加热10 min，彻底破坏细胞结构，测定终电导率（EC t）；以 ECi/ECt 表示相对电导率（R），然后根据下列公式（Thomas 等，1992），计算损伤指数（Ⅰd）：

$$\text{Ⅰ}d = 100\ (Rt - Ro)\ /\ (l - Ro)$$

Rt 和 Ro 分别为热胁迫叶片和对照（非胁迫）叶片之相对电导率。

1.7 丙二醛测定

仿 Dhindsa 等（1981）硫代巴比妥酸法，并适当改进。

1.7.1 MDA提取　1个叶片（约0.2500 g，精确称重）在盛有2 ml 0.6%（V/V）硫代巴比妥酸（TBA）三氯乙酸（TCA，20% V/V）提取剂的研钵中研磨2 min，转入离心管；研钵再用3 ml提取剂冲洗3次，转入离心管内混合；在4℃，6 000 r/min离心15 min；移取上清液，添加提取溶剂定容至5 ml；取1 ml上清液与1 ml 0.6% TBA混合，在100℃沸水浴加热10 min，随后在冰浴中冷却，然后在532、450、600 nm测定吸光值（Abs）。

1.7.2 MDA含量计算

MDA摩尔浓度(μmol/L)=6.45×(A532-A600)-0.56×A450

MDA质量摩尔浓度(μmol/g) = MDA摩尔浓度×N×W^{-1}

N——提取液体积（L）　　W——鲜重（g）

1.8 抗坏血酸测定

仿 Xu 等（2006）方法并作适当改进。

1.8.1 抗坏血酸标准曲线和回归方程制作　精确称取抗坏血酸10 mg→加2 ml 10%盐酸→加去离子水定容至100 ml（母液，浓度为100 μg/ml）→分别取0，1，2，4，5，8，10，12 ml母液，分别定容为100 ml（浓度分别为0，1，2，4，5，8，10，12 μg/ml）→分别取以上标准液2 ml→加1滴10%硫脲，1 ml 2%二硝基苯肼→混合→100℃水浴中煮沸20 min→冷至室温→冰浴中加入5 ml 80%（V/V）硫酸（1 min内加完，边加边摇动）→混合→室温下反应30 min→20℃、4 000 r/min离心10 min→取上清液于530 nm测定吸光值（Abs）→以抗坏血酸含量为横座标，Abs为纵座标绘制标准曲线，并求出回归方程。

1.8.2 抗坏血酸提取　精称1个叶片（约0.1500 g）→加2 ml 6%三氯乙酸（TCA）→研钵中研磨2 min→转入

15 ml 离心管→研钵用 3 ml TCA 冲洗 3 次，转入离心管混合→4℃，4 000 r/min 离心 10 min。

1.8.3　显色反应　取 2 ml 样液→加 1 滴 10%硫脲，1 ml 2%二硝基苯肼→混合→100℃水浴中煮沸 20 min→冷至室温→冰浴中加入 5 ml 80%（V/V）硫酸（1 min 内加完，边加边摇动）→混合→室温下反应 30 min→20℃，4 000 r/min 离心 10 min→取上清液于 530 nm 测定吸光值（Abs）

1.9　统计分析　采用 SPSS10.0 统计软件进行分析。

2　结果

(1) 露天栽培并套种高粱（起适当遮阴作用）的萝芙木于 2006 年 9～10 月（从定植到开花约 18 个月）即开花结果，而种植在无空调大棚内的萝芙木没有开花（图 1）。结果表明，种植在大棚内的萝芙木，可能由于高温胁迫，使得生长发育缓慢，开花结果推迟。

(2) 高温热胁迫后，萝芙木叶片电导率升高，且热胁迫温度越高，电导率越高（表 1）。

(3) 受高温热胁迫后，叶片细胞膜脂过氧化加剧，丙二醛含量升高（表 2）。统计分析表明，44℃、50℃热胁迫 2 h 产生的 MDA 含量与对照组含量差异显著（$P < 0.050$），两个高温组差异不显著（$P > 0.050$）。

(4) 抗坏血酸回归方程：$Abs530 = 0.041 + 0.051 * C$，式中 C 为抗坏血酸含量（μg/g）。

叶片直接 50℃高温胁迫 2 h 后，抗坏血酸含量比对照组下降；经 37℃热驯 1 h，又在 22℃恢复 1 h，再在 50℃高温胁迫 2 h（37℃/50℃），其抗坏血酸含量比对照组和 50℃直接高温胁迫组高（表 3）。另一个试验（表 4）亦与本试验结果基本吻合，即经热驯、恢复，再高温胁迫，较对照抗坏血酸含量高（注：两个试验所用叶片叶龄不相同）。

表 1　萝芙木热胁迫 2 h 后的电导率（mean±SD，5 个重复）

Table 1　The electric conductance in rauwolfia leaves underheat stress for 2 h (mean±SD, 5 replicates)

处理	相对电导率（R）	损伤指数（Id）
对照	0.06±0.02	
44℃ HS	0.13±0.03	7.85±2.78
50℃ HS	0.14±0.03	8.71±3.67

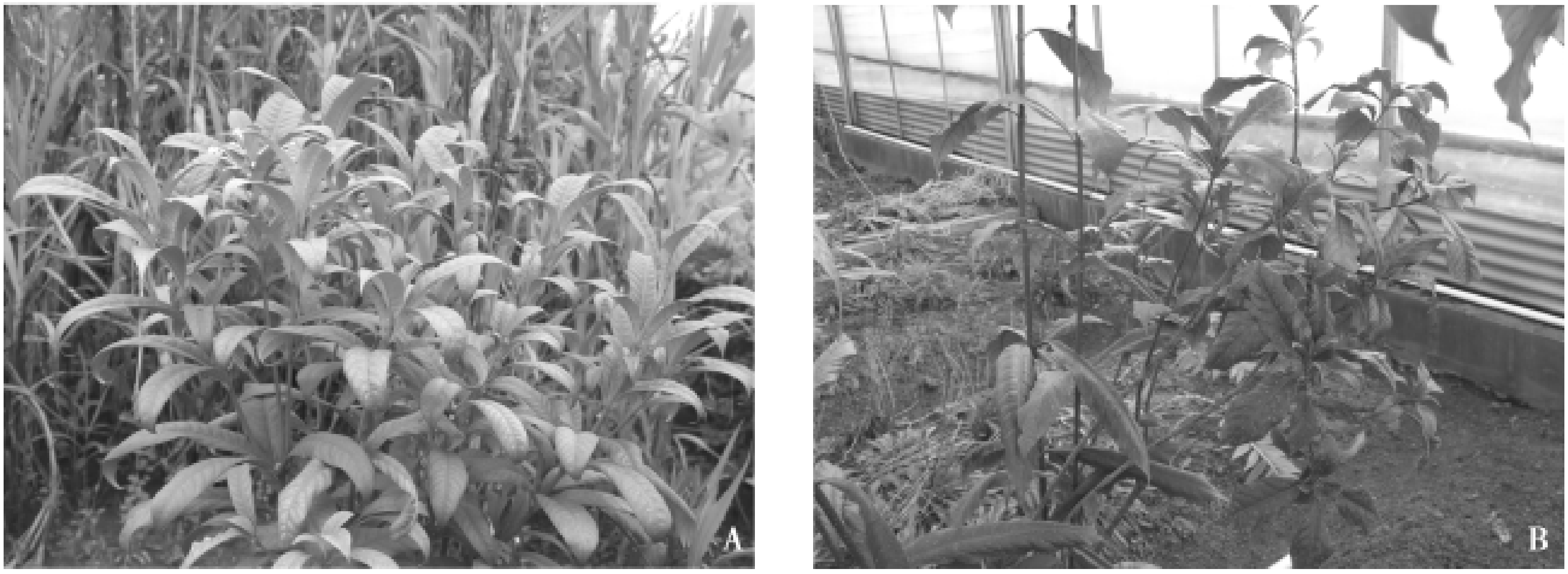

图 1　大棚内与露天种植萝芙木生长发育比较　　A. 露天栽培；B. 大棚内栽培

Fig. 1　The comparision between rauwolfias planted in the open air and greenhouse

A. planted in the open air; B. planted in greenhouse

表 2　萝芙木叶片热胁迫 2 h MDA 含量测定结果（mean±SD，5 个重复）

Table 2　The content of MDA in rauwolfia leaves underheat stress for 2 h (mean±SD, 5 replicates)

处理	MDA 含量 (μmol/g)
对照	0.007±0.001
44℃ HS	0.010±0.001
50℃ HS	0.011±0.003

表 3　萝芙木叶片热胁迫后抗坏血酸含量（mean±SD，5 个重复）

Table 3　The content of ascorbic ackd in rauwolfia leaves under heat stress (mean±SD, 5 replicates)

处理	抗坏血酸含量 (μg/g)
对照	997.6±58.6
37℃/50℃	1034.9±29.7
50℃	982±77.5

表 4　萝芙木叶片热胁迫后抗坏血酸含量（mean±SD，5 个重复）

Table 4　The content of ascorbic ackd in rauwolfia leaves under heat stress (mean±SD, 5 replicates)

处理	抗坏血酸含量 (μg/g)
对照	1436.7±153.1
37℃/44℃	1515.1±277.1

3 讨论

热胁迫期间产生的超氧自由基（O_2^-）、过氧化氢（H_2O_2）等活性氧中间体（ROS）损伤脂、蛋白质、碳水化合物、核酸等细胞成分（Monk等，1989），氧化胁迫导致植物光合作用和蒸腾作用受阻，进而抑制植物生长（Jiang and Huang，2001）。本研究表明，萝芙木经44℃以上高温胁迫后，细胞膜严重受损（电导率升高），膜脂过氧化加剧（MDA含量升高），自由基清除剂抗坏血酸含量下降，其结果将使萝芙木组织受损，导致生长发育减慢，开花结果推迟。本研究还证实，萝芙木通过适当亚高温（本研究为37℃）热驯，其抗坏血酸含量有一定提高，增强了抵抗高温诱发的氧化胁迫的能力。本研究与其他学者用其他植物材料研究的结果基本一致。

萝芙木原生境为灌丛、林下、溪边，属半阴性植物。管志斌（2004）指出，温度在21～30℃时萝芙木生长良好，可与橡胶、果树等经济作物间作。本研究栽培表明，露天种植，并套种高粱的萝芙木，由于高粱起遮阴作用，长势较好，提早开花结果。因此，发展萝芙木生产进行扦插育苗和生产时，作适当遮阴是必要的，这样可避免高温对萝芙木造成热损伤。

致谢 中国科学院昆明植物研究所李唯奇博士对本研究给予指导，并帮助修改英文摘要。

〔参 考 文 献〕

Chen WX (陈维新), Bai YC (白永成), 1979. The Alkaloids of *Rauvolfia yunnanensis* Tsiang [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **1** (2): 37—40

Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA, 1981. Leaf senescence: Correlated with increased leaves of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase [J]. *J Exp Bot*, **32**: 93—101

Guan ZB (管志斌), 2004. Cultivaion and exploitation of south Chinese medicine *Rauvolfia* [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), **23** (5): 54—56

Hong SW, Vierling E, 2000. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 4392—4397

Jiang Y, Huang B, 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season Turfgrasses in relationto antioxidant metabolism and lipid peroxidation [J]. *Crop Sci*, **41**: 436—442

Larkindale J, Hall JD, Knight MR *et al.*, 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of Thermotolerance [J]. *Plant Physiol*, **138**: 882—897

Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, 2004. Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis* [J]. *Mol Gen Genomics*, **271**: 11—21

Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM, 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress [J]. *Physiol Plant*, **76**: 456—459

Smirnoff N, 1995. Antioxidant Systems and Plant Response to the Environment [A]. In: Smirnoff N ed. Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation [M]. Oxford: Bios Scientific Publishers, 217—243

Thomas HW, Nina LB, Thomas GR *et al.*, 1992. An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues [J]. *Plant Physiol*, **98**: 198—205

Vierling E, 1991. The roles of heat shock proteins in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol*, **42**: 579—620

Xu S, Li J, Zhang X *et al.*, 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress [J]. *Environ Exp Bot*, **56**: 274—285